

【講演】

「麻疹ウイルス：ゲノム操作法の新技术とベクター開発への応用」

九州大学大学院医学研究院ウイルス学助教授 竹田誠

本日は、「麻疹ウイルス：ゲノム操作法の新技术とベクター開発への応用」という内容でお話させていただきます。

麻疹は、我々人類の代表的な急性ウイルス感染症です。発展途上国の小児を中心に、年間 3,000 万人以上がいまなお罹患し、年間で数十万人の人が麻疹によって死亡しております。しかしながら、麻疹に対しては効果、そして安全性ともに非常に優れた生ワクチンがあり、その生ワクチンを適切に接種することによって、我々はこの病気を完全に予防することができます。

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属のエンベロープを持ったウイルスです。ゲノムは非分節の一本鎖 RNA です。長さは約 16kb です。ゲノムの最上流にはプロモーター活性を持ったリーダー配列があり、そこから N、P、M、F、H、L の 6 つの遺伝子が並んでおります。トレーラー配列というものは、このゲノムがコピーされて、アンチゲノムになったときに働くプロモーター配列です。ゲノムは裸のままでは活性を持たないで、そこにこれらの遺伝子から発現した N 蛋白、P 蛋白、L 蛋白がゲノムに結合して、リボ核蛋白複合体 (RNP) を形成して、鋳型活性を発揮いたします。

エンベロープの表面には、リセプターへ結合する H 蛋白質と膜融合活性を持つ F 蛋白質の 2 種類の糖蛋白がスパイク状に並んでおります。マトリックス蛋白質は、RNP、エンベロープ、そして H、F 蛋白の細胞内領域のそれぞれと結合することにより、粒子形成の中心的な働きを担っております。

麻疹ウイルスは長らく、ベロ (Vero) 細胞などの非リンパ球系細胞を使って分離されておりました。しかしながら、そのような培養細胞を使って分離してきたウイルスというのは、実は病原性を持っていないということがわかってまいりました。1990 年に、当時予防衛生研究所、現在国立感染症研究所の小船先生らがマーモセット由来の B95a 細胞を使うと、病原性を保持した、すなわち真性の麻疹ウイルスを分離できるということを報告いたしました。

そこで我々は、その小船先生のウイルスのゲノム RNA の全長を cDNA 化して、その全長 cDNA をプラスミドに組み込みました。そして、そのプラスミドから再び感染性を持ったウイルスを合成することに成功いたしました。このように改変を自由自在に行えるプラスミ

ドから生きたウイルスを得られるということは、理論上この生きたウイルスに自由自在の変異を入れることができるということになります。

実際にプラスミドから得たウイルスが、小船先生が示されたようにサルに対して、ヒトの麻疹類似の病態を引き起こし、病理学的にもヒトの麻疹に酷似した病理像を呈するという病原性を保持しているということを確認いたしました。このことによって、真性の麻疹ウイルスのゲノムと病原性との関係を研究する重要な基盤が出来上がったわけです。

本来、野生株が増殖できないようなさまざまな培養細胞で、繰り返し繰り返し継代することにより、経験則に則ってワクチン株が作られてきましたが、この過程でいったいウイルスに何が起こったのかということにわれわれは、興味を持ってまいりました。このような継代の過程でワクチン株が誕生したけれども、この過程で何が起こったのかということを知りたかったわけです。

あるワクチン株について、詳しく研究をいたしました。その結果はここに示したように、そのワクチン株のゲノムのコードする多くの蛋白質で機能的な変化があり、我々はその機能変化とそれら機能変化の責任アミノ酸のいくつかを同定することに成功しました。このような成果を得るために、組換えウイルスを作る技術が大いに役立っております。さらにその技術を用いて、これまで機能のわかっていなかったC蛋白質が、自然免疫の発動を抑制する機能を持つこと、また、M遺伝子、F遺伝子の間の長い非翻訳領域が宿主細胞の障害を軽減するような効果のある領域であることがわかってまいりました。

これらの研究を進めながら、研究をより効率良く推進させていくために、我々は系の改良を行ってまいりました。本日は時間の都合上、詳細は述べませんが、CHO細胞を利用すること、もしくはカスパーゼ阻害剤、天然痘のワクチンであったLister株を用いたりすることなどにより、従来、訓練を積んだウイルス学者でなければ回収できなかった麻疹ウイルスを、誰にでも極めて容易に得ることができる系が完成いたしました。麻疹ウイルスは、モノネガウイルスとしては、現在もっとも簡単に操作のできるウイルスになっております。これはプラスミドを導入した細胞で、GFPを発現する麻疹ウイルスを作っている像ですが、このようにDNAを導入して約2日で、視野の至るところから巨細胞を形成しながら麻疹ウイルスが誕生してくるということがわかります。

本日のテーマであるベクターやワクチン開発について、麻疹ウイルスを利用することの利点があるかどうか、あるならどういうことかについて考えてみました。麻疹ウイルスを基礎にする場合、麻疹ウイルスを使う最大のメリットは、先ほど言いましたように麻疹ウイルスでは安全性および効果ともに非常に優れた生ワクチンがありますので、その生ワクチンをベースにしたベクター開発が可能であるということ、そして、我々の研究から、ワ

クチン株には実際どのような変化が起こったかということがわかってまいりましたので、その知識を基に分子生物学的手法で、系統的な弱毒化を行ったワクチンを作ることができるという点が、まず最初に挙げられます。

これについては後に述べますが、麻疹ウイルスは遺伝子発現の機構が非常に単純ですので、外来遺伝子を挿入する多価ワクチン等のデザインが非常に簡単であるという有利な点があります。また、麻疹ウイルスの増殖というのは、すべて細胞質内で完結しますので、宿主ゲノムに対する影響を心配する必要がないのも大きな利点です。

そして、アメリカのチームが麻疹ウイルスのリセプター結合蛋白質（H 蛋白）を操作することによって、例えばがん細胞、しかも特定のがん細胞等に麻疹ウイルスを標的化して感染させるという技術を確認しております。その技術を用いることによって、好きな細胞へ感染させることもできます。それらの点が麻疹ウイルスを使う利点ではないかと考えます。

では、ゲノム構造から簡単に説明したいと思います。先ほど言いましたように、両端のリーダー(Le)、トレーラー(Tr)配列はそれぞれゲノムるとき、アンチゲノムるときに働くプロモーター領域です。6つの遺伝子のそれぞれの両末端には、転写開始配列、転写終結配列と呼ばれる短い転写の制御配列があります。それらの遺伝子が単純に6個並んでいる構造です。それらのゲノムの間には、麻疹ウイルスの場合、わずか3塩基の介在配列という配列があって、それぞれのゲノムをつないでおります。イメージとしては、電車のように両端に制御する配列があって、単純に遺伝子が連結されている、そういう構造をしております。

遺伝子発現の仕組みですが、そのプロモーター配列にウイルスのポリメラーゼが結合します。そして、そのポリメラーゼは、各遺伝子の両末端にある転写開始、転写終結配列を認識しながら、それぞれの遺伝子情報をメッセンジャーRNA へと転写してまいります。ですが、次の車両、すなわち次の遺伝子の転写を再開する効率は100%ではないために、下流の遺伝子ほど遺伝子発現が低くなるという polar attenuation of transcription という特徴的な遺伝子発現のパターンをしております。

麻疹ウイルスは、巨細胞を形成しながら増殖いたします。外来遺伝子を発現させたい場合には、このように単純にグリーン車両を追加してやれば、緑の蛍光を発する麻疹ウイルスが出来上がってまいります。ですが、この際に問題点が1つあります。外来遺伝子の挿入によって、下流の遺伝子の発現が順次下がってまいります。ですので、多数の外来遺伝子の挿入は不可能ではないけれども（学会発表などでは3つまでの遺伝子挿入が一応報告はされてはいますが）ウイルスとしてはかなり生存能力が低下してまいります。

我々の実験の実例を示してみたいと思います。それぞれ1つずつ、外来遺伝子を挿入しました。これはDsRed2という約0.7kbの遺伝子。こちらは約3.0kbの外來性遺伝子(Lac Z)です。長い遺伝子挿入のほうが影響は大きく、このように1遺伝子を挿入しただけで、1日後で見ると100倍近くウイルスの増殖が低下しております。

そこで、我々はこのウイルスゲノム(非分節のウイルスゲノム)を2本に分節化することを考えてみました。2つに分け、それぞれの両末端にプロモーター配列を配置いたします。このように2本の分節のそれぞれに外来遺伝子、つまり2つの外来遺伝子を挿入しました。分節化により期待される効果は、両方の分節にプロモーター配列がありますので、ポリメラーゼはこの両方にアクセスすることができます。そのことによって、下流の遺伝子発現がさほど大きな影響を受けず、むしろ発現量が高まるという効果が期待されます。実際にウイルスを合成してみると、2分節のゲノムをもつウイルスは生存可能であって、緑の蛍光、赤い蛍光(2種類の外来性蛋白)を発現しながら、非常に効率良く増殖しているのがわかります。

ウイルスの増殖を調べてみると、このように野生型の普通のウイルスと比べて、2つの外来遺伝子の挿入にもかかわらず、ウイルスの増殖は同等もしくはそれよりも若干高い増殖能力を示すことがわかりました。ですので、このようにプラークを形成させてみても、野生型と比べて何ら遜色のない、大きくて鮮やかなプラークを形成することがわかります。当然、そのプラークは、このように2色の蛍光を発しています。

次に、3本に分節してみることにしました。先ほどと同じように、それぞれの分節の両末端には、このようにプロモーター配列を配置してあります。これを用いて、3つの外来遺伝子挿入を行いました。ウイルスの合成は可能であって、野生型と同等の効率でウイルスを合成することができます。このように2色の蛍光を発しながら、巨細胞を形成して、麻疹ウイルスが効率良く増殖しているのがわかります。プラーク形成も良好で、このように2色の蛍光を発したプラークが出来上がってまいります。今度はさらに、そこにlac Z遺伝子から出てくる、βガラクトシターゼによる青い染色像を得ることができます。3つの外来性遺伝子を良好に発現しているウイルスであることがわかります。

蛋白の合成量を解析してみました。このように非分節の本来のゲノムにDsRed2遺伝子を挿入したウイルス、本来のゲノムにlac Z遺伝子を挿入したウイルス、そして、2分節化して2つの外来遺伝子を挿入したウイルス、3分節化して、3つの外来性遺伝子を挿入したウイルスで、蛋白合成を比較してみました。結果は、一目瞭然ですが、非分節ゲノムに1遺伝子挿入したウイルスよりも、2あるいは3分節ゲノムをもつウイルスの方が、蛋白合成が優れていることがわかります。これは下流の、特にいちばん最後のLというポリメ

ラーゼの遺伝子発現が、分節化によって高く維持されているからだと考えられます。

それでは、一体いくつ入るのかということで、さらに2番目の分節にCATとSEAPと呼ばれるエンザイムをコードさせてみました。そのような（計5つの外来性遺伝子をコードした）ウイルスの合成はやはり可能で、このように麻疹ウイルスの作る巨細胞がEGFPという緑の蛍光、DsRed2という赤い蛍光、そして β ガラクトシターゼによって青く染色され、すなわち、3つの蛋白質を同時に発現していることがわかります。そして、そのウイルスは確かに増殖することができ、その増殖に伴ってSEAPというエンザイム、CATというエンザイムの活性が上がってくるということがわかります。すなわち合計5つの外来性遺伝子を良好に発現する麻疹ウイルスが合成できたわけです。

現在、transに麻疹ウイルスの蛋白質を供給することにより、自己増殖能を欠く麻疹ウイルスベクターの作製に取り組んでおります。

われわれは非常に効率の良い麻疹ウイルスの遺伝子操作系を開発してまいりました。われわれの研究の主目的というものは、このシステムを使って麻疹ウイルスがどうやって高い病原性を発揮するのか、ワクチン株がどのような分子メカニズムで弱毒化しているのかということの研究することであります。われわれの研究によって、多くのことがわかってまいりました。この知識や技術というものは、麻疹ウイルスのワクチン開発、麻疹ウイルスをベースとしたベクターの開発に大いに役立つ成果であります。

麻疹ウイルスのワクチン株を使ったがん治療というものが、米国では既に臨床治験が行われております。われわれの得た知識や技術が、さらに良いがん治療用麻疹ウイルスベクターの開発に役立つと考えております。われわれの研究から、麻疹ウイルスのゲノムは実は分節化することができて、そのことによって、他遺伝子挿入型のベクターが開発できるということがわかってまいりました。このような技術の発展によって、VLP産生型ワクチン、多価ワクチン、あるいは非増殖型ベクターなどの開発がさらに進んでいくものと考えています。これらのベクターは、がん治療ベクター、再生医療用、あるいは遺伝子治療用ベクターとしての用途にも、大いに役に立ってくると考えております。

このようなモノネガウイルスのゲノムを分節化するという手法自体は、ほかの既に有用性がはっきりしているニューキャッスル病ウイルス、もしくはセンダイウイルスなどに応用が可能であると考えられます。ですので、既にあるそれらのウイルスの技術と融合させることによって、新たなウイルスベクターの開発が進んでいくものと考えております。

本研究は、東大医科研、そして国立感染症研究所、そして九州大学を通じて行ってきた研究であります。ここに示します先生（敬称略：柳雄介、永井美之、竹内薫、加藤篤、小船富美夫、田代真人、宮嶋直子、永田典代、網康至、須崎百合子、皆川洋子、大野真治、

関文緒、田原舞乃、中津祐一郎、橋口隆生、塩田達雄、坂井優子、坂田宏子、佐藤威、小浜友昭、小原道法、木所稔、瀬谷司) はじめ多くの先生方のご指導とご協力を得てやってまいりました。ここに感謝申し上げます。

ご清聴ありがとうございます。

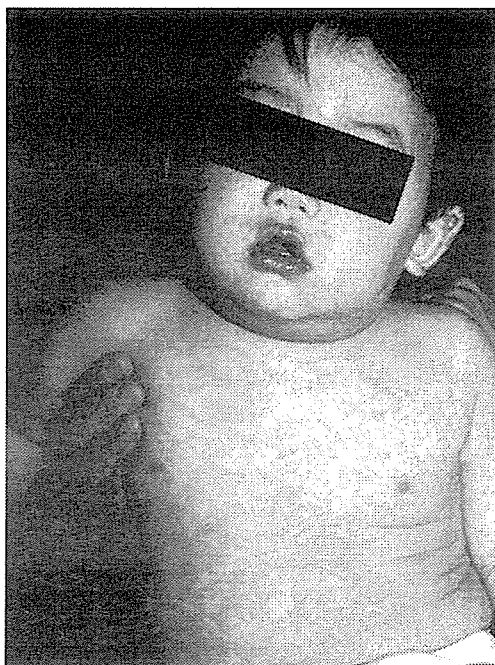
日本発のワクチン開発をめざして
アジュバント、投与方法、そしてベクターからのワクチンイノベーション
2007年2月7日

麻疹ウイルス：ゲノム操作法の新技術と ベクター開発への応用

九州大学・大学院・医学研究院・ウイルス学

竹田 誠、柳 雄介

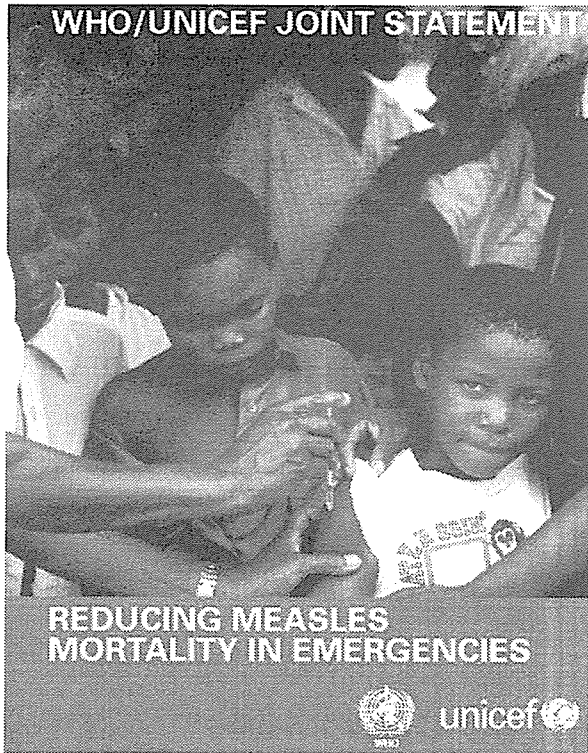
麻疹



年間3000万人以上が罹患
45万人以上が死亡（2004年）

WHO

写真：うえじま小児科上島亮先生



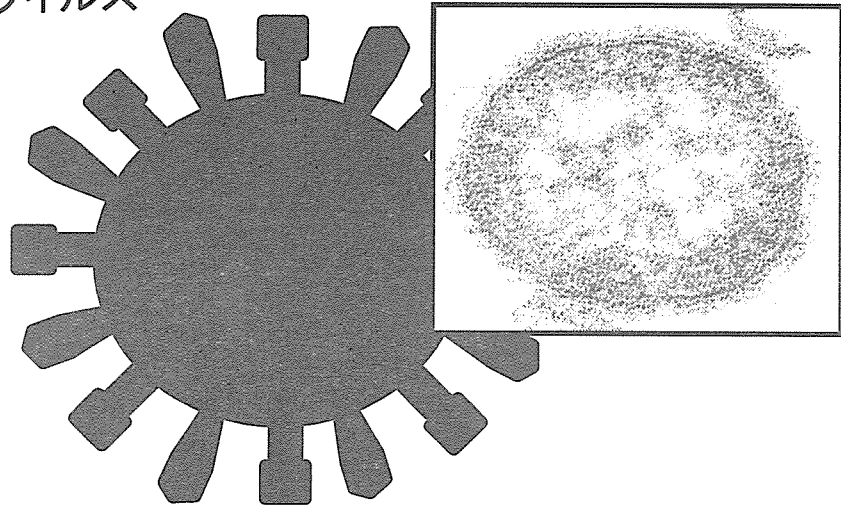
麻疹には有効かつ安全な生ワクチンがあります

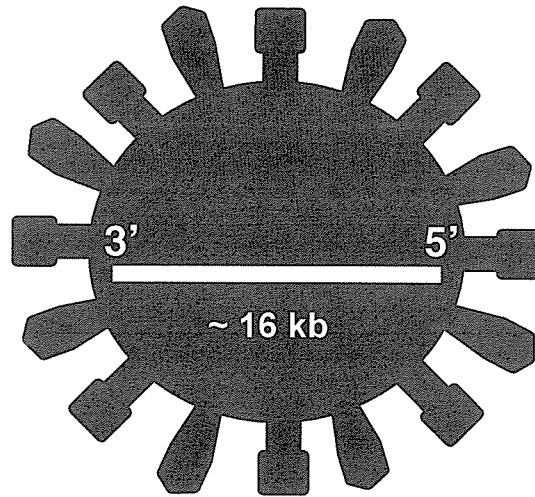


麻疹ウイルス

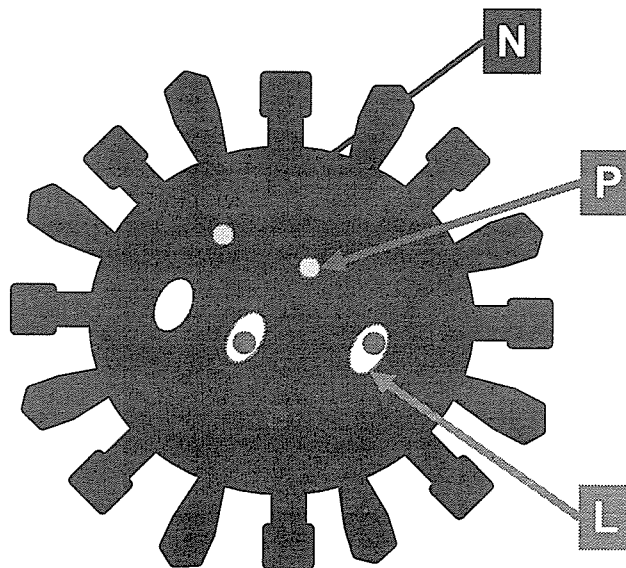
パラミクソウイルス科 モルビリウイルス

エンベロープウイルス



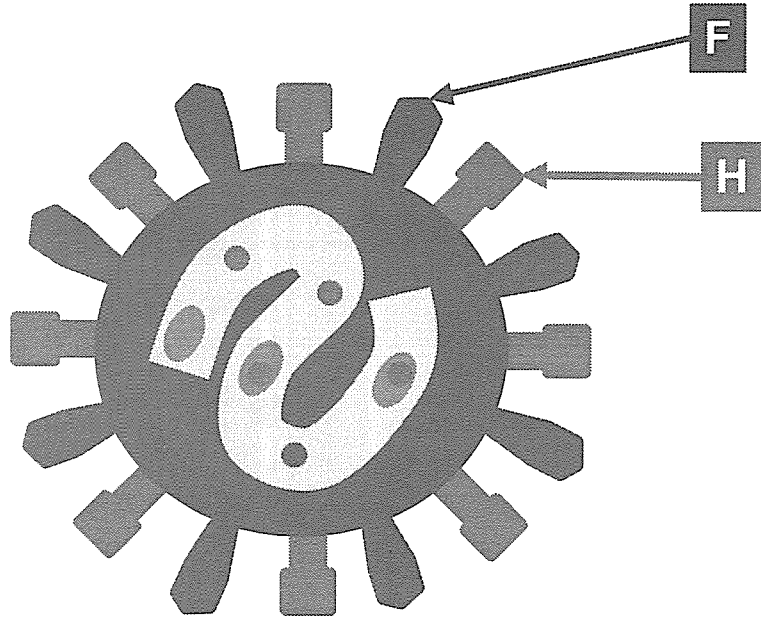


非分節型マイナス鎖RNAゲノム

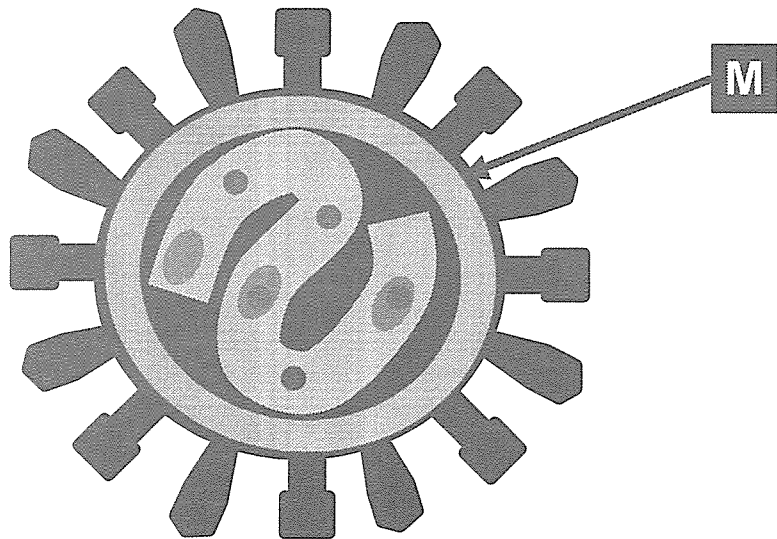


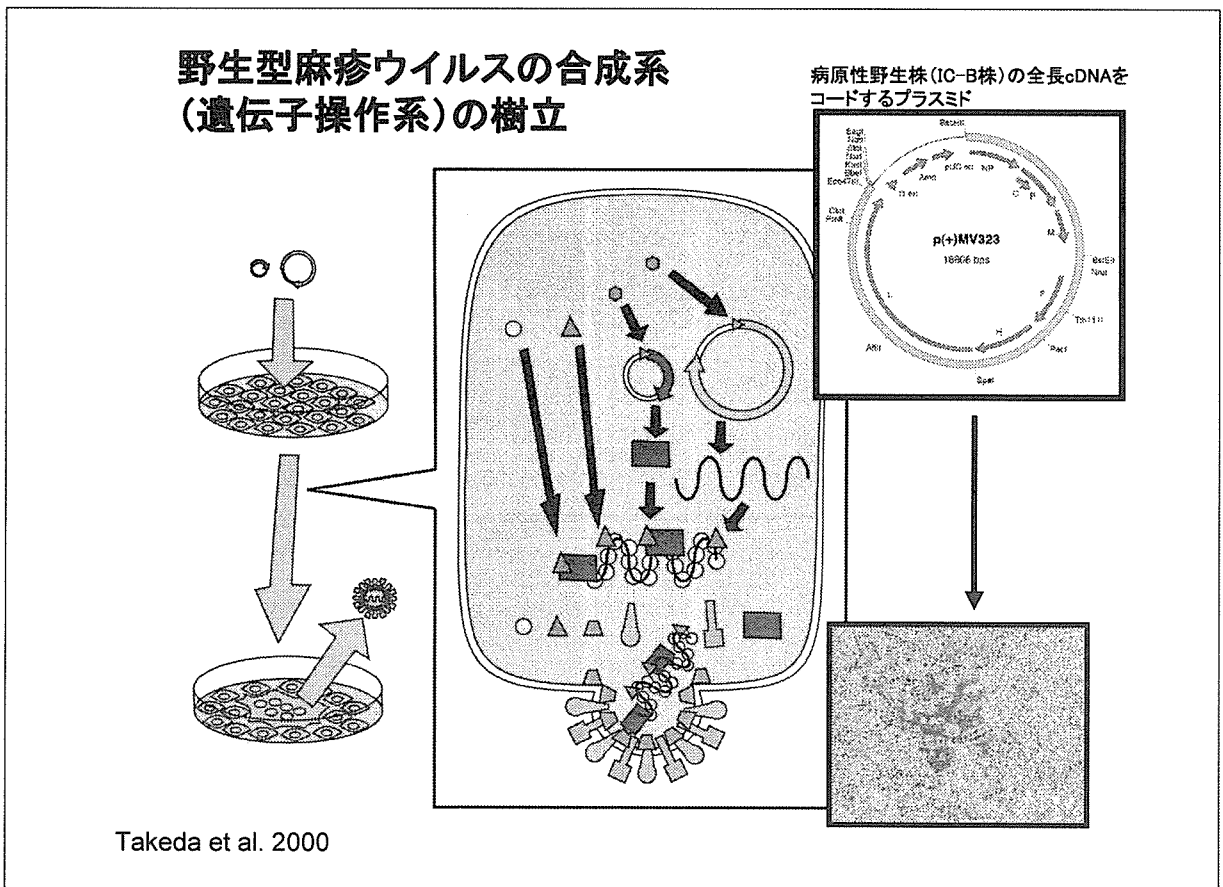
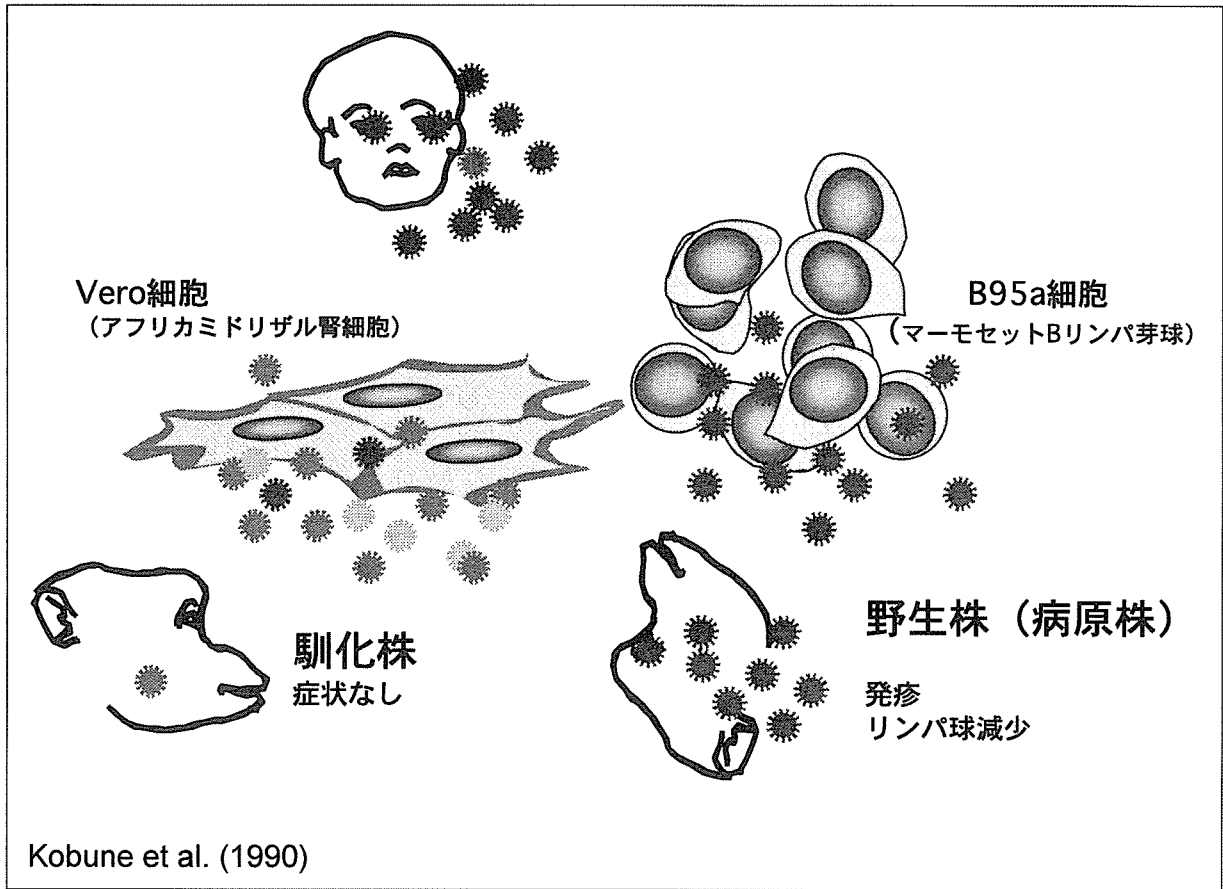
リボヌクレオカプシド複合体

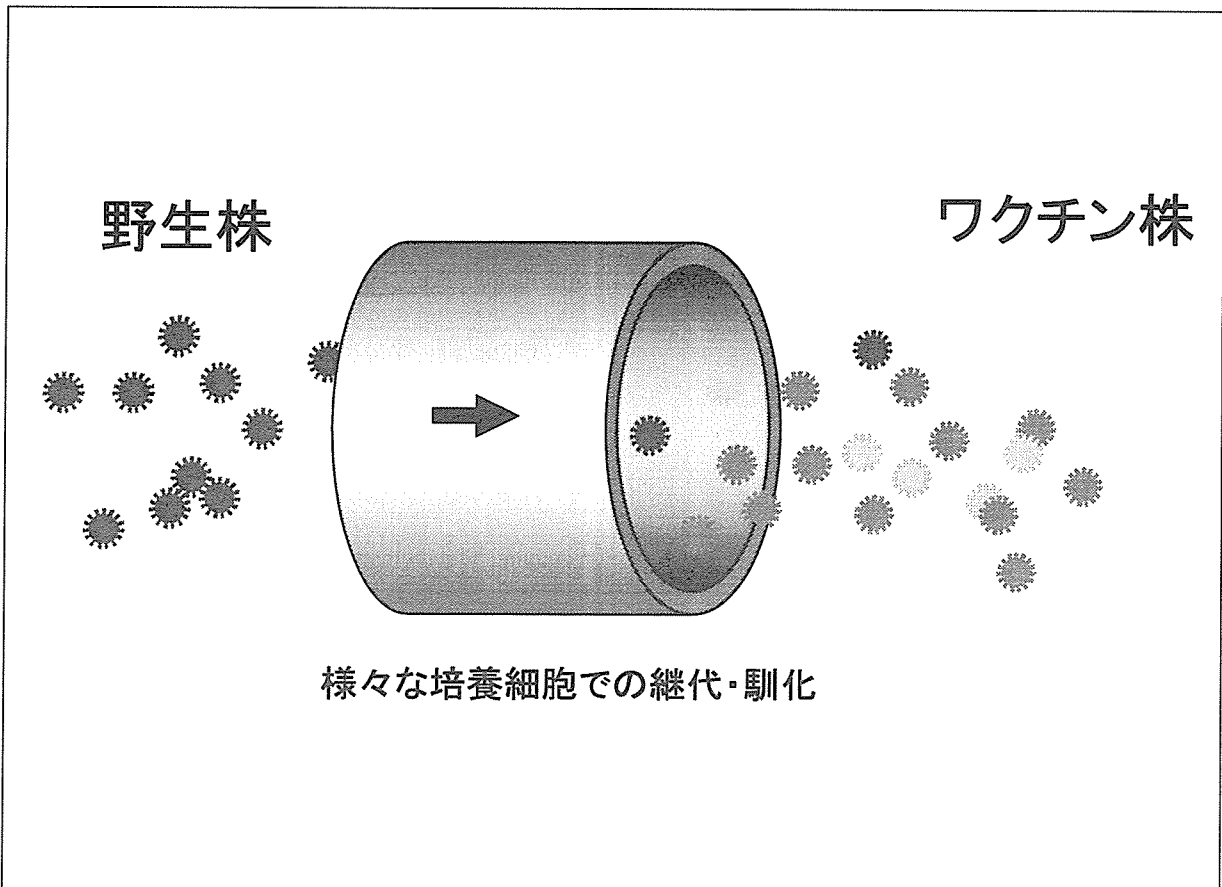
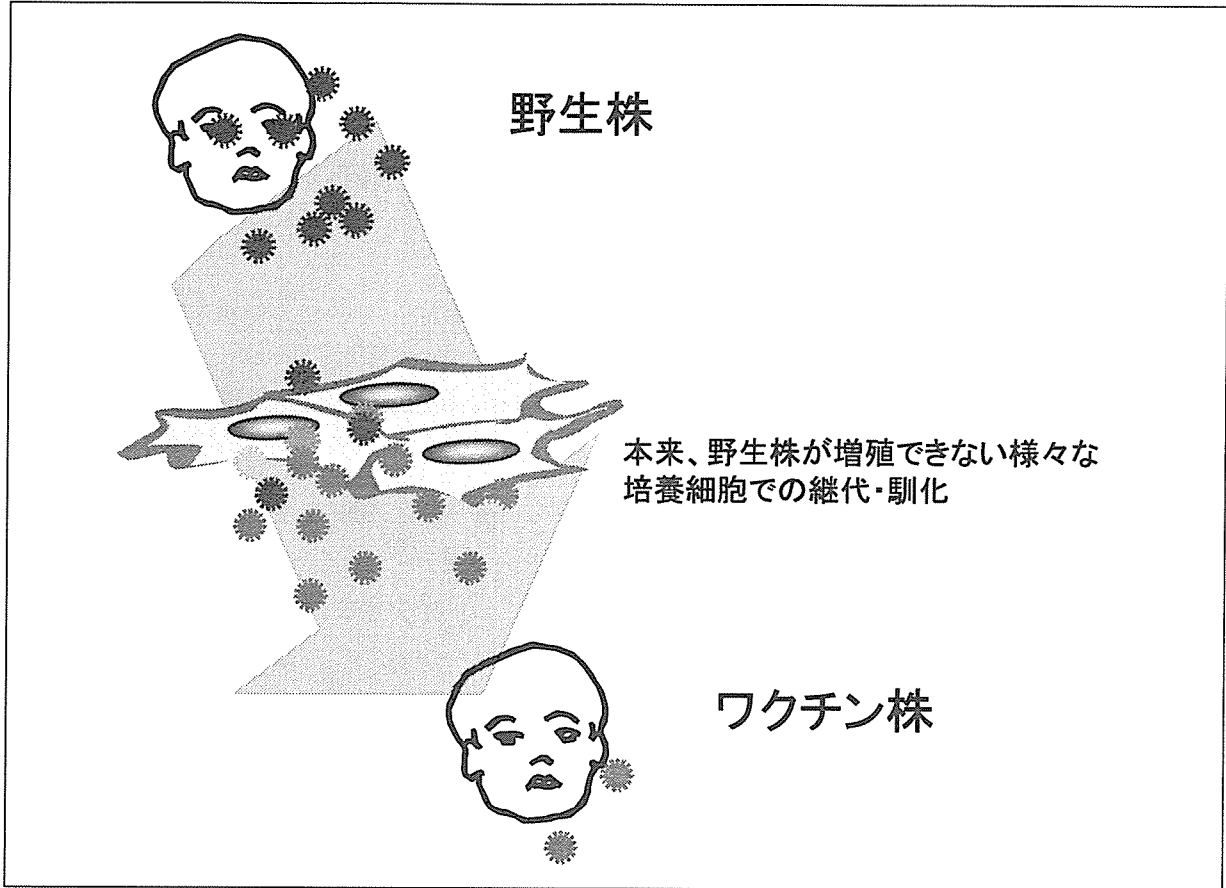
3' Le N P M F H L Tr 5'



3' Le N P M F H L Tr 5'

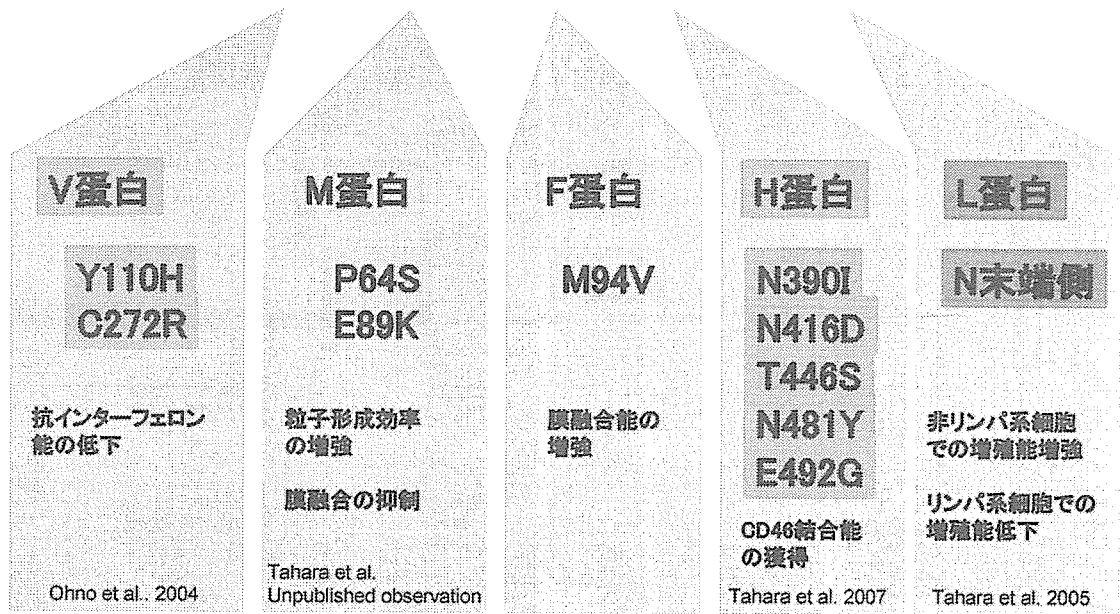






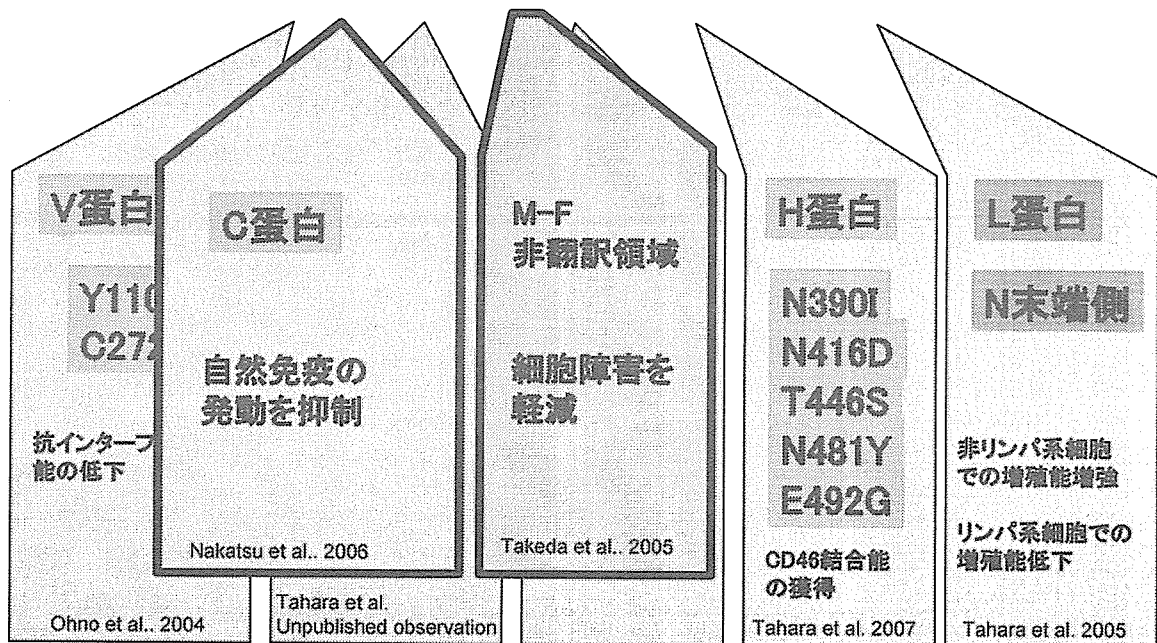
細胞馴化によるEdmonston-tag株蛋白の機能変化と、それを担うアミノ酸変化

3' Le N P/N/C M F H L Tr 5'



細胞馴化によるEdmonston-tag株蛋白の機能変化と、それを担うアミノ酸変化

3' Le N P/N/C M F H L Tr 5'



麻疹ウイルス遺伝子操作系の開発と改良

直径3.5cmの培養皿から得られる
cDNAからのウイルス産生細胞数

野生株遺伝子操作系の樹立

Takeda et al. (2000)

～ 0.3

ワクシニアウイルス&CHO/hSLAMシステムの導入

Takeda et al. (2005)

～ 70

カスパーゼ阻害剤、ワクシニアウイルスListerワクチン株の利用

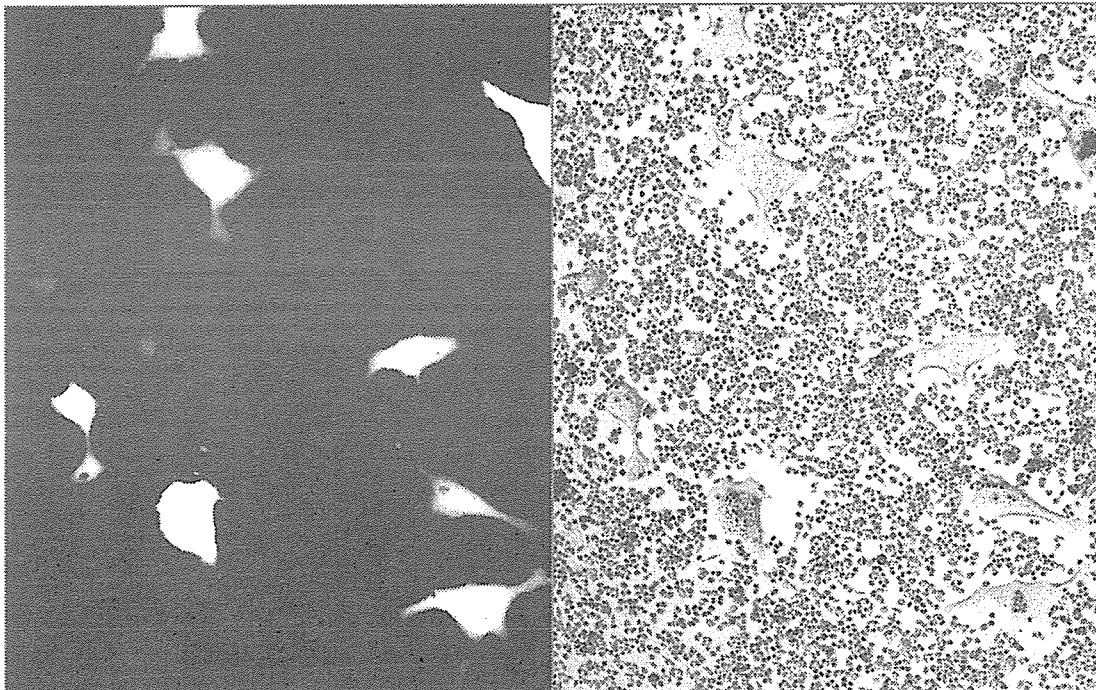
Nakatsu et al. (2006)

～ 70

Takeda et al. (2006)

～ 250

CHO細胞とvTF7-3、カスパーゼ阻害剤を利用した麻疹ウイルス合成システム (3.5cm培養皿中の数百～千個の細胞が麻疹ウイルスの合成を開始する)



緑色蛍光蛋白(EGFP)を発現する麻疹ウイルスの回収

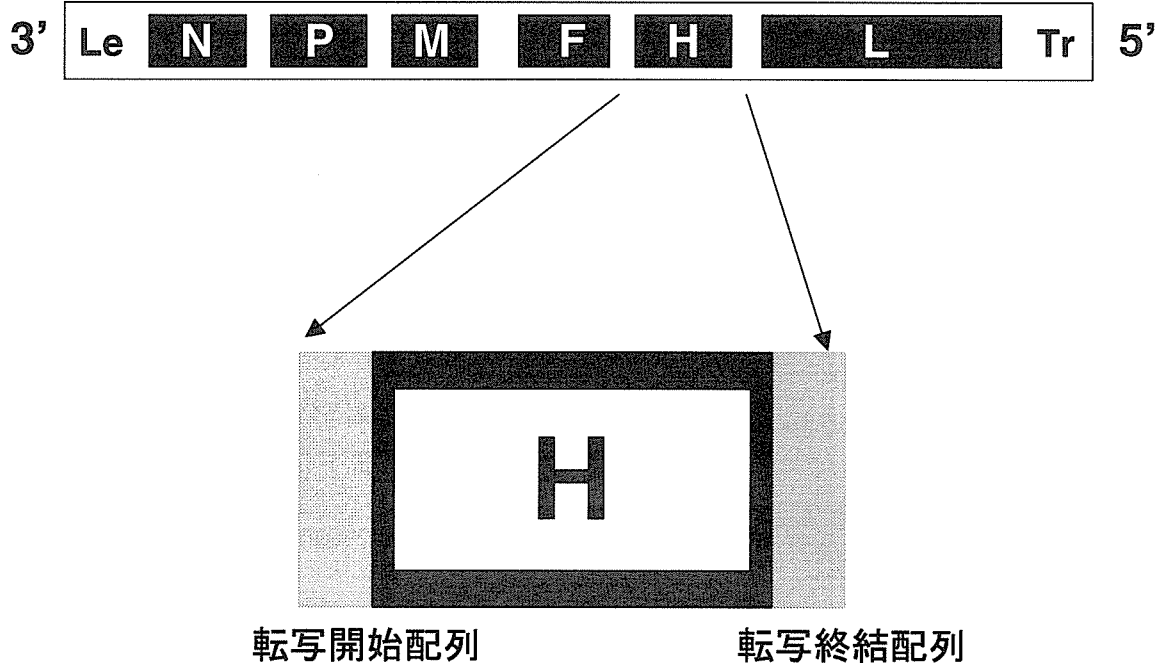
麻疹ウイルスを基礎にしたベクターや多価ワクチン開発の利点

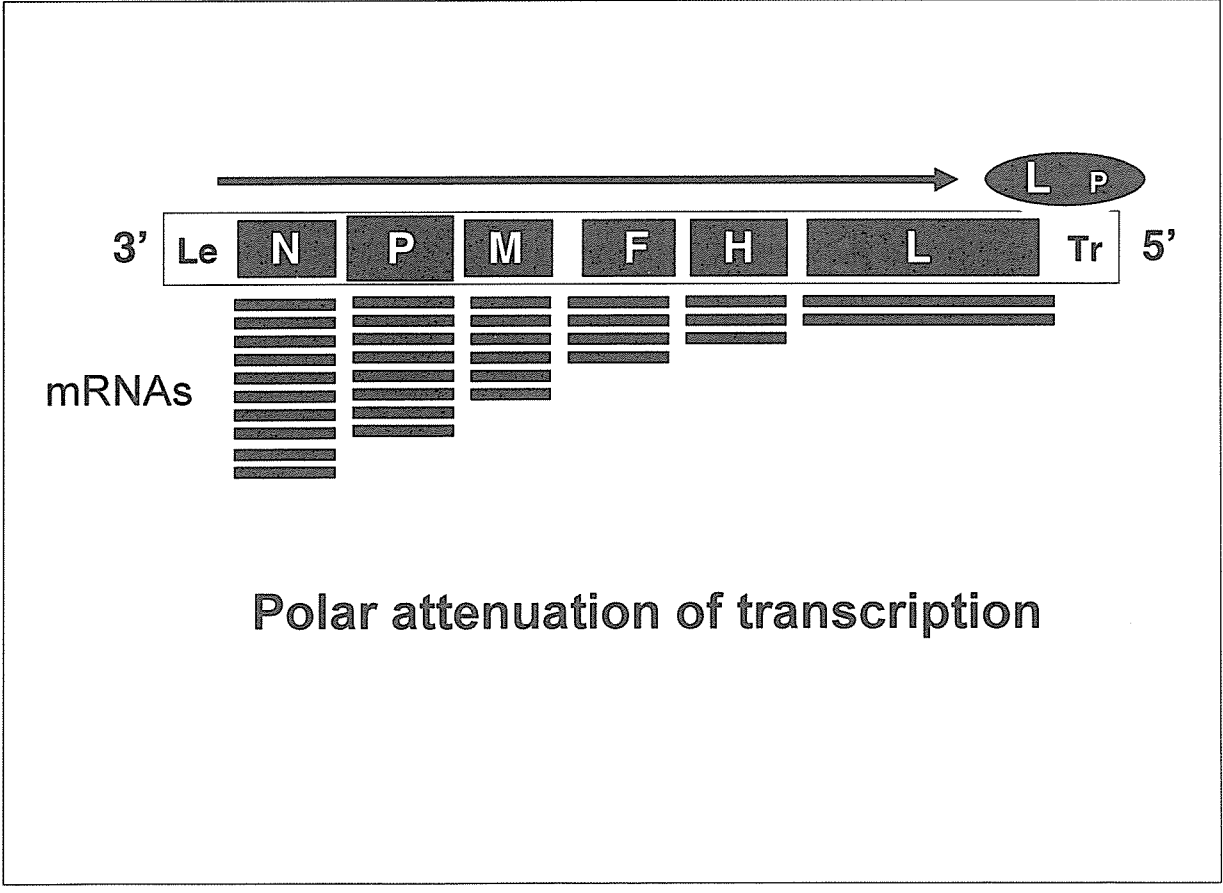
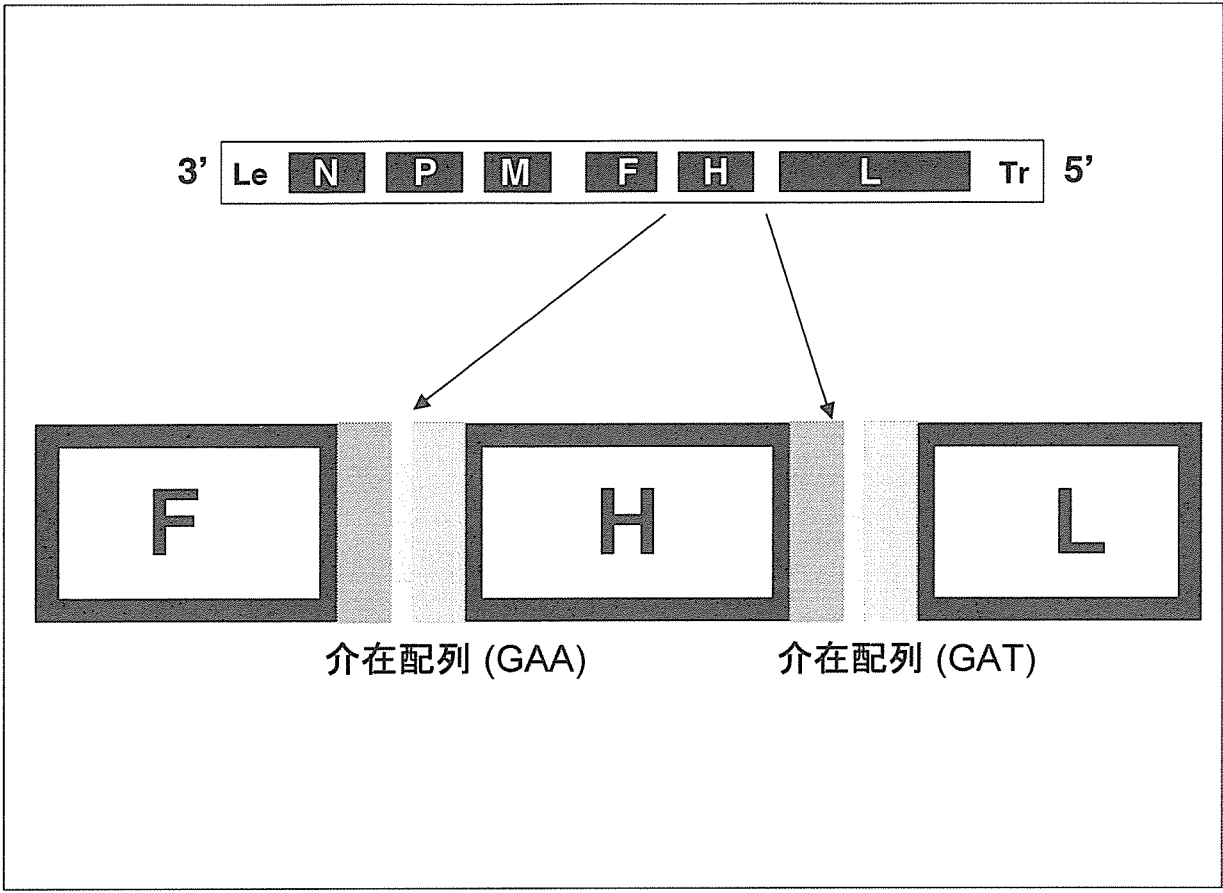
有効かつ安全性の優れた生ワクチン株があり、その株を基礎にしたベクター開発が可能である。
計画的に弱毒化したベクターの開発が可能である。

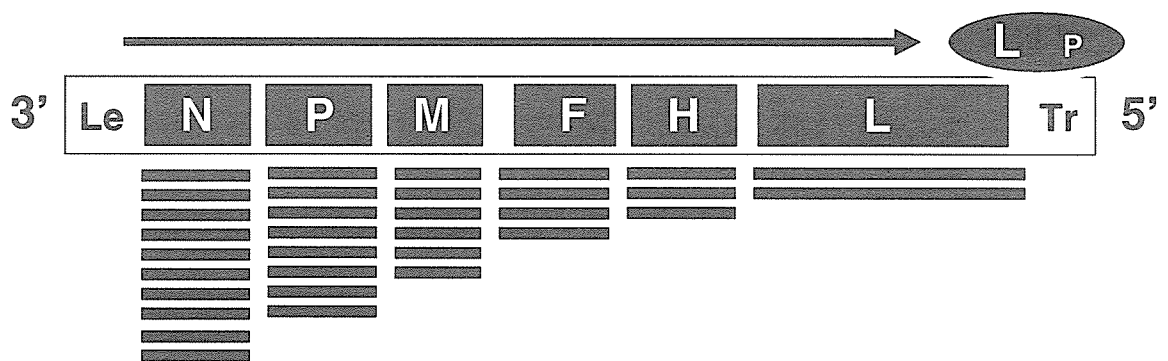
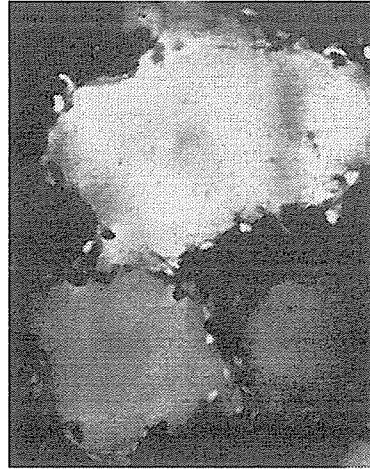
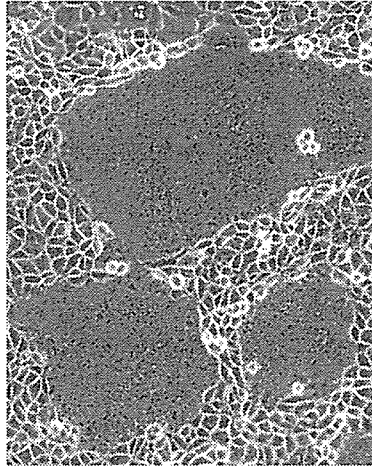
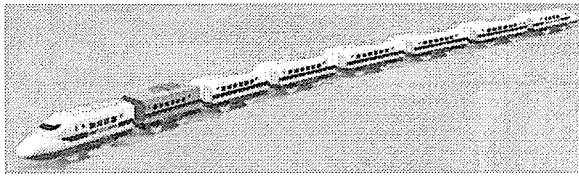
遺伝子発現の機構が単純である。

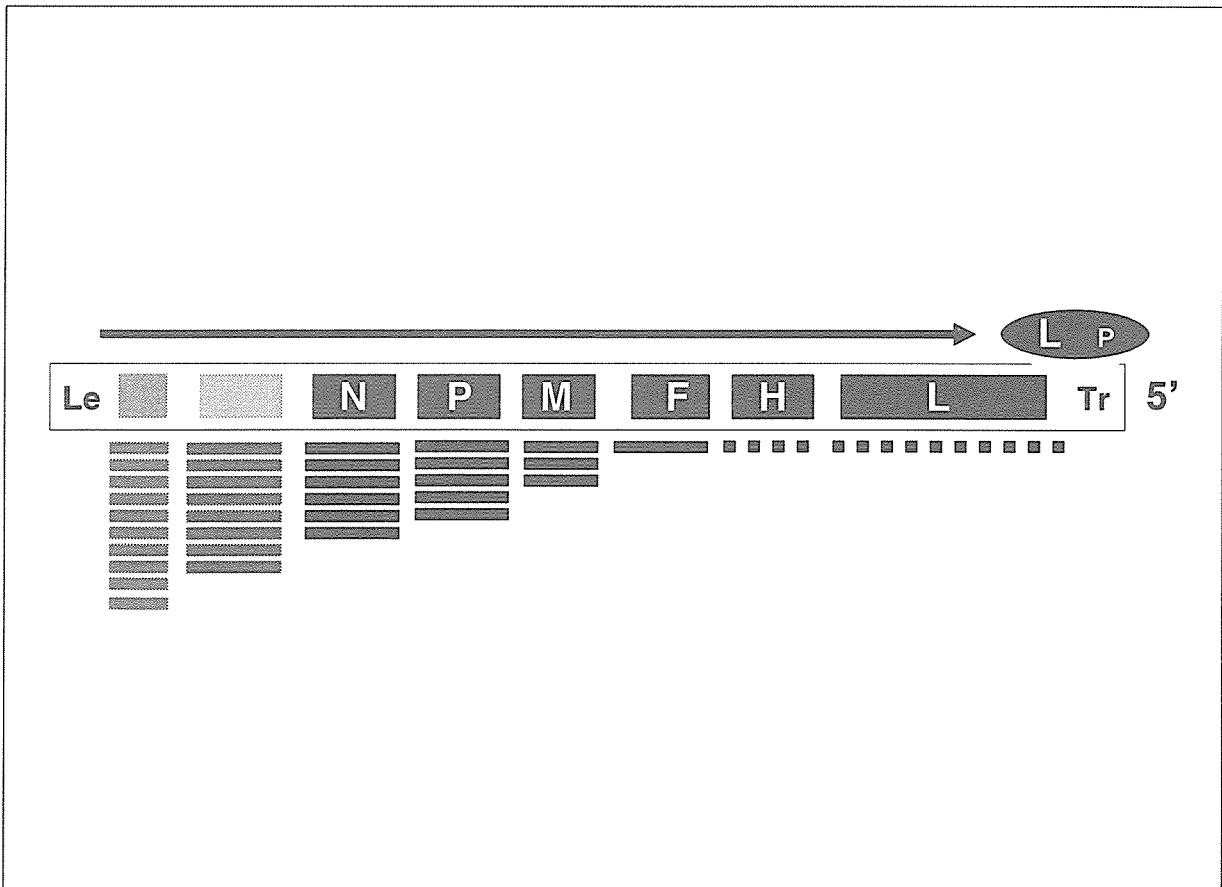
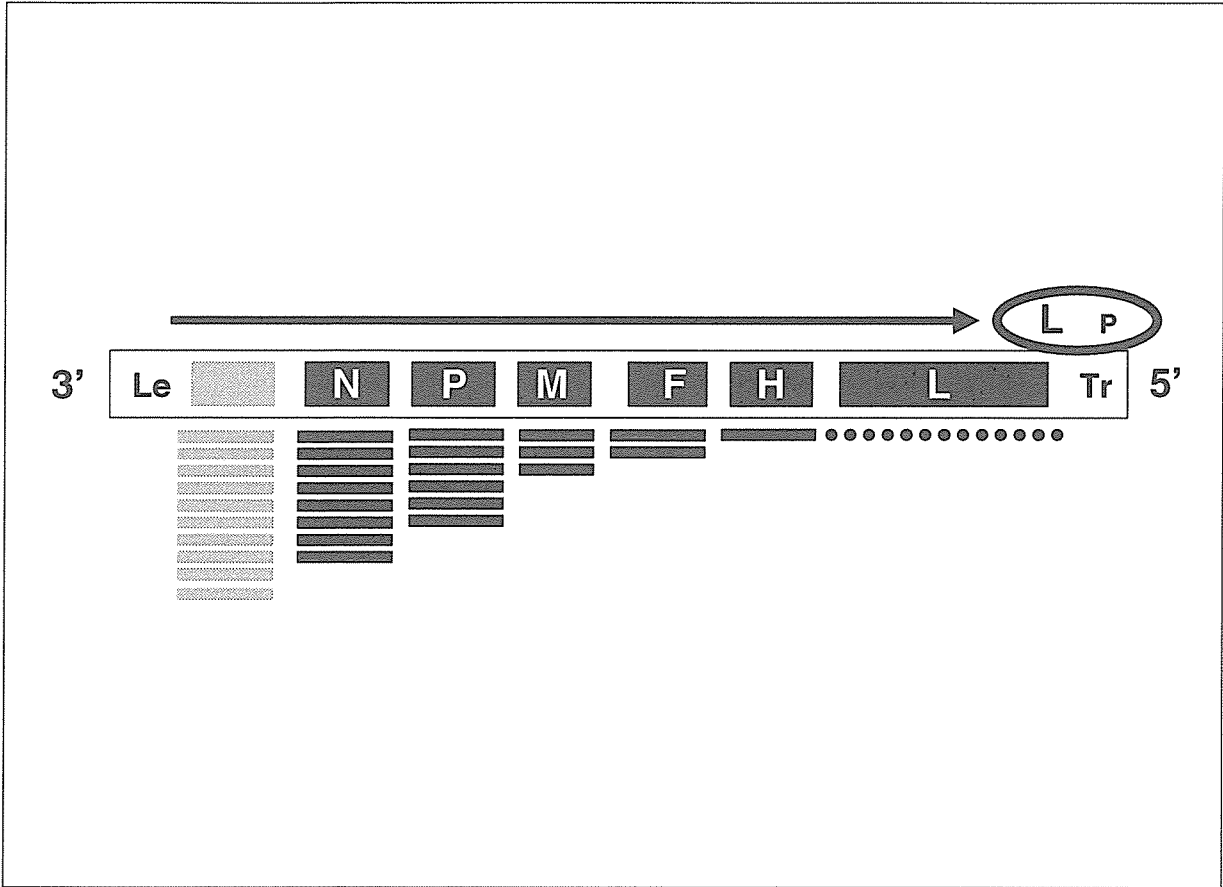
細胞質で増殖し、宿主細胞のゲノムに影響を与えない。

特定の細胞への標的化技術が確立している (Nakamura et al. 2005 Nat Biotechnol)











外来性遺伝子挿入によるウイルス増殖能の低下

